

Gyulladás indukálta hám-mesenchyma/mesothel-makrofág átalakulás vizsgálata a hashártya mesothel sejtjeiben

Doktori tézisek

Dr. Katz Sándor László

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. L. Kiss Anna, Ph.D., CSc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss András, Ph.D., egyetemi docens,
Dr. Keller-Pintér Anikó Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA tagja, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens,
Dr. Molnár Kinga, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2015

Bevezetés

A mesothelium egyrétegű laphámsejtekből – mesothel sejtekből – álló réteg, amely béleli a test savós üregeit. A mesothel sejtek nem csak egy súrlódásmentes felszínt biztosítanak glükózaminoglikánok és a hialuronsav termelésük révén, hanem részt vesznek a transzmesotheliális transzportban, gyulladásos mediátorokat termelnek, képesek az antigénprezentációra, részt vesznek a tumor növekedésben és –disszeminációban, a koagulációs és fibrinolitikus folyamatokban, de jelentős szereppel bírnak a hashártya regenerációja során is (Mutsaers 2002).

A mesothel sejtek lapos, elnyúlt sejtek, amelyeket leginkább a magjuk alapján lehet azonosítani. Mind az apikális, mind a bazális plazmamembránon nagyszámú palack-, omega-alakú membránbefüzdés figyelhető meg. A citoplazmájukban csak néhány sejtorganelum (mitokondriumok, endoplazmás retikulum és néhány multivezikuláris test) figyelhető meg. A mezenterialis kötőszövetben csak néhány sejtes elem (fibrociták, hízósejtek és granulociták), ill. kollagénrost kötegek és erek láthatóak (Katz és mtsai 2011, 2012).

A Freund adjuváns intraperitoneális injekciója hám-mesenchyma átalakulást (EMT) vált ki a hashártya mesothel sejtjeiben (Katz és mtsai 2012). Az EMT fogalmát Elisabeth Hay vezette be 1995-ben a csirkeembrió primitív csíkjának fejlődése kapcsán (Hay 1995).

A hám-mesenchyma átalakulás lépései:

- a hámsejtek elveszítik az intercelluláris kapcsolataikat,
- elveszítik polaritásukat,
- a bazális membrán degradálódik,
- a citoszkeleton átrendeződik,
- a sejtek képessé válnak a migrációra.

Az EMT-nek három típusát különíthetjük el: az I típus az embriogenezis, szervfejlődés során; a III típus a tumornövekedés és –disszeminációs folyamatok kapcsán figyelhető meg, míg a II típus a szövetregeneráció és fibrózis során, a gyulladásos stimulus fennállásáig tartó folyamat (Kalluri és Weinberg 2009).

Mesothel sejt-makrofág átalakulás?

Laboratóriumunkban korábban elvégzett vizsgálatok egyértelműen igazolják, hogy a Freund adjuváns kiváltotta hashártyagyulladás során a hasüregben drámai módon megemelkedik a peritoneális makrofágok száma (Kiss és Kittel 1995, Katz és mtsai 2011). A peritoneális makrofágok eredete mind a mai napig nem egyértelműen tisztázott. Több forrásból is származhatnak. A vérből stimulus hatására az erek falán át kivándorló monociták, valamint a hashártya ún. tejfoltjaiban nyugvó, rezidens makrofágok aktiválódása, migrációja nagymértékben járul hozzá a hasüregben megjelenő, heterogén eredetű makrofág populációhoz. A gyulladás során a hasüregben megjelenő makrofágok nagy száma azonban nehezen magyarázható csupán csak ezzel a két forrással (a kezeletlen állatok hasüregében 10^5 /ml, míg a gyulladás-indukció hatására 10^7 /ml a peritoneális makrofágok száma). Az adjuváns kezelés hatására bekövetkező nagymértékű morfológiai változások, és a mesothel sejtek leválása a mezentériumról felveti annak a lehetőségét, hogy ezek a sejtek speciális stimulus hatására makrofággá vagy makrofág-szerű sejté differenciálódhatnak, és egy harmadik forrásul szolgálhatnak a peritoneális makrofágoknak.

GM-CSF és GM-CSF receptor

Granulocyte-macrophage-colony stimulating-factor (GM-CSF) a makrofágok terminális differenciációját indukálja (Shiomi és Usui 2015). A GM-CSF, mint hemopoetikus citokin fokozza az aktivitását és a túlélését a granulocitáknak, makrofágoknak és dendritikus sejteknek, de képes fokozni a proliferációját számos nem hemopoetikus sejtípusnak (oszteoblaszt, simaizom, endotél és epitel sejteknek) is (Rasko és Grough 1994). Ezt a citokint az aktivált T-limfociták (Gasson és mtsai 1984), monociták, fibroblasztok, endotélsejtek és aktivált keratinociták is képesek termelni (Metcalf és mtsai 1986, Kupper és mtsai 1988).

A GM-CSF a hatását egy citokin-specifikus α és egy közös βc alegységből felépülő heterodimer receptoron keresztül fejti ki (Martinez-Moczygemba és Huston 2003). A GM-CSF jelátviteli mechanizmusának szabályozásában a legfontosabb szerepet a citoszolikus tirozin kinázok játsszák, ezek közül a legfontosabb a Janus kináz 2 (JAK2). A GM-CSF kötődése a receptorához számos jelátviteli útvonalat aktivál: JAK/STAT, MAPK, PI3K és NF- κ B, amelyek együttesen szabályozzák a sejtek proliferációját, differenciációját és túlélését (van de Laar és mtsai 2012).

Célkitűzések

1. Vizsgálataim során, nyomon kívántam követni a Freund adjuváns kiváltotta morfológiai változásokat a hashártya mesothel sejtjeiben.
2. A mesothel sejtek plaszticitását és a hám-mesenchyma átalakulás során bekövetkező citoszkeletális átrendeződés lépéseit immuncitokémiai módszerekkel vizsgáltam.
3. A mesothel sejt-makrofág átalakulás *in vitro* vizsgálatára egy hashártya tenyésztési technikát dolgoztam ki. Az átalakulás kiváltása céljából a primer mezentérium kultúrákat GM-CSF-el kezeltem és a kiváltott változásokat fény- és elektronmikroszkópos technikákkal vizsgáltam.
4. Kísérleteim során igazolni szerettem volna a GM-CSF receptor jelenlétét a mezentérium kultúrák mesothel sejtjein, ezért GM-CSF receptor α ellenanyaggal kimutatást végeztem. A mesothel sejt-makrofág átalakulás bizonyítására ED1 pán-makrofág markert alkalmaztam.
5. A GM-CSF jelenlétét az *in vivo* rendszerben (a gyulladás különböző időpontjaiból származó peritoneális mosófolyadékból és a mesothel sejtek lizátumából) Western Blot analízis segítségével szerettem volna bizonyítani.
6. A GM-CSF receptor *in vivo* rendszerben való jelenlétét a mesothel sejteken immuncitokémiai és Western Blot technikákkal kívántam igazolni. A mesothel sejt-makrofág átalakulást a gyulladás különböző időpontjaiból származó hashártyamintákon ED1 antitest segítségével szerettem volna bizonyítani, mind immuncitokémiai, mind Western Blot analízissel.
7. Annak igazolására, hogy a mesothel sejtek átalakulásához szükség van a receptor-ligand internalizációjára, Dynasore kezeléssel gátoltam a burkos vezikulák plazmamembránról való lefüződését, majd vizsgáltam a mesothel sejtek ED1 expresszióját.

Módszerek

Anyag:

In vivo kísérletek: A hashártyagyulladás kiváltására 1 ml komplett Freund adjuvánst injektáltam a 70-90 napos, hím, Sprague-Dawley patkányok (200-250g) hasüregébe. 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 20 napos inkubációs idők után a kezelt és kezeletlen állatok hashártyáját eltávolítottam.

In vitro kísérletek: a primer mezentérium kultúrákat kezeletlen állatok hashártyájának eltávolításával, majd Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) tenyésztői médiumban 37°C-on, 5% CO₂ koncentráción való inkubálásával hoztam létre. A mintákat GM-CSF-el kezeltem (1 ng/ml), majd 1, 2, 3, 6, 8 és 24 órán keresztül termosztátban tartottam. Az endocitózis blokkolására a mezentérium kultúrákat 80µM Dynasore-ral 1 órán keresztül előkezelttem, ill. a citokinkezelést ezzel kiegészítettem.

Alkalmazott módszerek:

- fény- és elektronmikroszkópia
- immuncitokémia
- Western Blot

Eredmények

1) A Freund adjuváns intraperitoneális injekciója akut hashártyagyulladást vált ki a patkányok hasüregében. Az adjuvánskezelés hatására (3-5. nap) a lapos, elnyúlt mesothel sejtek térfogata megnő, köbalakúvá válnak, citoplazma nyúlványokat növesztenek a mezenterialis kötőszövet felé, elveszítik intercelluláris kapcsolataikat és több sejt el is hagyja a hashártya felszínét. A citoplazmájukban megnő a sejtorganellumok száma: több mitokondrium, jól fejlett Golgi-készülék, durvafelszínű endoplazmás retikulum és multivezikuláris test figyelhető meg; sejtkapcsoló struktúráik szétestek, a bazális lamina degradálódott és elveszítették polaritásukat. A gyulladás 6-7. napjaiban több autofág vakuolum látható a felszínen rétegekbe rendeződött mesothel sejtek citoplazmájában, több levált sejt is megfigyelhető a hashártya közelében. A mezenterialis kötőszövetben megnőtt a sejtes elemek és az erek száma. A gyulladás 8-9. napjaiban az autofág vakuolumok dominálnak a még nagyobb térfogatú mesothel sejtekben, jelezve, hogy a regeneráció elkezdődött, de néhány sejt között már megfigyelhetők a sejtkapcsoló struktúrák. A gyulladás-indukciót követő 11. napon a mesothel sejtek laposak, elnyúltak, teljesen befedik a mezentérium mindkét felszínét a citoplazmájukban csak néhány sejtorganellum látható, a

bazális lamina és a sejtkapcsoló struktúrák jól megfigyelhetőek. A hashártya morfológiája hasonló a kezeletlen állatból származó mintákhoz.

2) Az EMT során megfigyelhető citoszeletális átrendeződést immuncitokémiai módszerekkel követtem nyomon. A Freund adjuváns kiváltotta gyulladás során vizsgáltam a citokeratin (hámsejtekre jellemző intermedier filamentum fehérje) és a vimentin (leginkább a kötőszöveti sejtekre jellemző citoszeletális fehérje) expresszióját a mesothel sejtekben. A gyulladás hatására a sejtek citokeratin expressziója folyamatosan csökken, majd megszűnik, ezzel párhuzamosan a vimentin expressziója fokozódik.

Annak igazolására, hogy a mesothel sejtek plasztikus sejtpopulációt képviselnek Hsp47 és nestin kimutatást végeztem. A kezeletlen mesothel sejtekben kimutathatóak ezeket a fehérjék, és a gyulladás hatására expressziójuk fokozódik.

3) A GM-CSF mesothel sejtekre gyakorolt hatását *in vitro* kísérletekkel vizsgáltam: a primer mezentérium kultúrákat DMEM/F12 tenyésztői médiumban inkubáltam 1, 3, 6, 8, 12, 24, 48 órán keresztül. Amikor a médiumhoz GM-CSF-t adtam (1 ng/ml) és 6-8 óráig inkubáltam, a mesothel sejtekben drámai változások történtek: a citoplazma térfogata nagymértékben megnőtt, a sejtek kerekdedebbé váltak, a mezenterialis kötőszövetben több, vastag kollagénrost köteg volt megfigyelhető. A mesothel sejtek citoplazma nyúlványokat növesztettek, több sejt között az intercelluláris kapcsolatok megszűntek, jelezve, hogy polaritásukat elveszítették.

4) A három napig tenyésztői médiumban inkubált mezentérium kultúrák mesothel sejtjei nem expresszálják az ED1 makrofág markert. Ezzel szemben a 6-8 órás 1 ng/ml-es GM-CSF kezelés hatására erőteljes ED1 immunpozitivitás volt tapasztalható. A GM-CSF által kiváltott változások háttérben jelátviteli folyamatok állnak. Annak igazolására, hogy a jelátvitel során szükséges-e a ligand internalizációja, Dynasore kezelést alkalmaztam. A Dynasore gátolja mind a clathrin-burkos vezikulák, mind a caveolák lefűződését a plazmamembránról (Fletcher és mtsai 2012). Dynasore jelenlétében a mesothel sejtek nem expresszálták az ED1-et.

A GM-CSF hatásának kifejtéséhez szükséges a receptorának jelenléte a mesothel sejteken. Immuncitokémiai vizsgálataim kimutatták, hogy a három napig tenyésztői médiumban inkubált mezentérium kultúrák mesothel sejtjei expresszálják a GM-CSF receptort. Amennyiben a DMEM/F12-t GM-CSF-el egészítem ki, a 8 órás inkubációt követően nagymértékű GM-CSF receptor α expresszió-fokozódás volt tapasztalható, mind a plazmamembránon, mind a citoplazmában.

5) A GM-CSF jelenlétét az *in vivo* rendszerben vizsgálva, Western Blot analízissel bizonyítottam, hogy a peritoneális mosófolyadékban a citokin csúcskoncentrációja a

gyulladás 5-8. napjaiban volt megfigyelhető. Érdekes adat, hogy a GM-CSF, mind a kezeletlen, mind a gyulladást követő regenerációs fázisban is - kis mértékben ugyan -, de kimutatható a hasüregben, jelezve, hogy a citokin állandó komponense a hasúri folyadéknak.

Annak bizonyítására, hogy a mesothel sejtek képesek termelni ezt a citokint a gyulladás különböző időpontjaiból származó mesothel sejtek lizátumából mutattam ki a GM-CSF-et Western Blot technikával. A kezeletlen állatokból származó mesothel sejtek a GM-CSF-et nem expresszálják, de a gyulladás-indukciót követő 3. napon már kimutatható a jelenléte. A citokin az expressziós maximumát az 5. napon éri el, utána mennyisége csökken, míg a 11. napon már nem kimutatható.

6) A GM-CSF receptor kimutatható a kezeletlen állatokból származó minták mesothel sejtjein, bár citoplazmatikus lokalizációjuk a laphámjellegből adódóan nehezen megítélhető, a konfokális mikroszkóppal készített felvételeken a plazmamembránhoz kapcsolódnak. A gyulladás 3. napján, amikor a mesothel sejtek köbalakúvá válnak, a receptor expressziója fokozódik és a citoplazmában több immunpozitív struktúra figyelhető meg. A gyulladás 5. napján az immunpozitív struktúrák mérete megnő és mélyen a citoplazmában helyezkednek el. Az immuncitokémiai vizsgálatok alátámasztására a GM-CSF-receptor α -át Western Blot vizsgálattal is kimutattam a gyulladás különböző időpontjában a mesothel sejtek lizátumából. A receptor kimutatható a kezeletlen sejtekből, de expressziója a gyulladás hatására fokozódik, maximumát az 5. napon éri el, utána mennyisége csökken.

A kezeletlen állatokból származó mesothel sejtek lizátumában az ED1 (mesothel sejt-makrofág átalakulás indikátora) nem kimutatható, míg a gyulladás 3. napján a sejtek már expresszálják és csúcskoncentrációját az 5. napon éri el. Az immuncitokémiai vizsgálatok alátámasztják az immunoblot eredményeket: a kezeletlen mesothel sejtekben a makrofág marker nem kimutatható, a gyulladás hatására azonban expressziója fokozódik.

Következtetések

A Freund adjuváns peritoneális injekciója markáns változásokat eredményez a patkányok mezentériumát fedő mesothel sejtek morfológiájában. A gyulladás-indukció hatására sejtprolifерáció, citoskeletális átrendeződés és migráció figyelhető meg. Az adjuváns kezelés kiváltotta gyulladás hatására a mesothel sejtekben bekövetkező morfológiai változások arra utalnak, hogy ezek a sejtek hám-mesenchyma átalakuláson (EMT) mennek keresztül. A munkám során elvégzett immuncitokémiai vizsgálatok (citokeratin és vimentin expressziós változásai, Hsp47 és nestin pozitivitás) igazolják a mesothel sejtek II típusú hám-mesenchyma átalakulását.

A Freund adjuváns kiváltotta akut peritonitisz során a hasüregben drámai mértékben megnő a peritoneális makrofágok száma. A mesothel sejtek adjuváns kezelés hatására bekövetkező markáns változásai, ill. a citoskeletonális fehérjék expressziójának változása és a sejtek Hsp47, nestin pozitivitása, felveti a lehetőségét annak, hogy a mesothel sejtek hám-mesenchyma átalakulás révén hozzájárulhatnak ehhez a nagymennyiségben megjelenő makrofág populációhoz. A gyulladás során a mesothel sejtek leválnak a mezentérium felszínéről, a makrofágokhoz hasonló morfológiát mutatnak és makrofág markereket expresszálnak (ED1, OX43, CD63). A mesothel sejt-makrofág átalakulás kiváltására GM-CSF kezelést alkalmaztam primer mezentérium kultúrákon. A citokinkezelés hatására a mesothel sejtek térfogata megnőtt, a sejtek elveszítették sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolataikat és ED1 markert kezdtek expresszálni. Ez igazolta, hogy a GM-CSF képes kiváltani a mesothel sejt-makrofág átalakulást. Az alkalmazott immuncitokémiai vizsgálataim során kimutattam a GM-CSF receptorát mind az *in vivo*, mind az *in vitro* rendszerből származó mintákon. Western Blot vizsgálataim igazolták, hogy a mesothel sejtek termelik és szekretálják a GM-CSF-et, amely hatását feltehetőleg autokrin szabályozással fejti ki.

Az elvégzett *in vitro* és *in vivo* kísérleteim egyértelműen bizonyítják, hogy a gyulladás során a mesothel sejtek hám-mesenchyma átalakuláson mennek keresztül. Az EMT során képesek makrofággá vagy makrofág-szerű sejté differenciálódni és az átalakuláshoz az összes faktor (receptor és citokin) is jelen van a mesothel sejtekben vagy azok felszínén.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Balogh P, Katz S, Kiss AL. (2012) The role of endocytic pathways in TGF- β signalling. Pathol Oncol Res, 19 (2): 141-148.

Balogh P, Szabó A, Katz S, Likó I, Patócs A, Kiss AL. (2013) Estrogen receptor alpha is expressed in mesenteric mesothelial cells and is internalized in caveolae upon Freund's adjuvant treatment. PLoS One, 8 (11): e79508. doi: 10.1371/journal.pone.0079508.

Katz S, Balogh P, Nagy N, Kiss AL. (2012) Epithelial-to-mesenchymal transition induced by Freund's adjuvant treatment in rat mesothelial cells: a morphological and immunocytochemical study. Pathol Oncol Res, 18 (3): 641-649.

Katz S, Balogh P, Kiss AL. (2011) Mesothelial cells can detach from the mesentery and differentiate into macrophage-like cells. APMIS, 119 (11): 782-793.

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények:

Nincs.

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, mentoromnak Dr. L. Kiss Annának, aki mindig segítőkész, önzetlen módon egyengette a kísérleteimet, pályámat, kifogyhatatlan ötleteivel előrevitte a munkámat és egy otthonos, baráti légkört biztosított a laborban!

Hálával tartozom Prof. Dr. Szél Ágostonnak, hogy az Intézet minden támogatást megadott számomra a munka elkészítéséhez és Prof. Dr. Röhlich Pálnak a cikkek és a disszertáció bírálatával kapcsolatosan megfogalmazott értékes kritikai megjegyzéseiért!

Továbbá köszönettel tartozom kollégáimnak, barátaimnak a sok segítségért:

Szemere Lászlóné Katinak, Dóczi Nikolettnek, Dr. Szabó Arnoldnak, Zsiros Viktóriának, Kutasi Ferencné Margitnak, Biczó Ádámnak, Dr. Botos-Babity Erzsébetnek, Balogh Petrának.